

VERGLEICHENDE SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DEN ANTIGENGEGHALT VON
SALMONELLEN

VON
HELGA LAHR

1962

Aus dem Hygiene-Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

(Direktor: Professor Dr. H. Kliewe)

VERGLEICHENDE SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

ÜBER DEN ANTIGENGEGHALT VON

SALMONELLEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

HELGA LAHR

aus Gumbsheim/Rhh.



MAINZ 1962

Dekan: Professor Dr. Dr. K. Lang
Referent: Professor Dr. Dr. G. Gillissen
Korreferent: Professor Dr. H. Kliewe
Tag der mündlichen Prüfung: 2. Februar 1962



GESAMTHERSTELLUNG:

DITTERS BÜRODIENST, MAINZ, Augustinerstraße 64-66

INHALT

1. Einleitung und Ziel der Arbeit
2. Die Antigenstruktur von Salmonellen und die Isolierung von Antigenen
3. Der Einfluß homospezifischer Immunsereen auf Salmonellen

EIGENE VERSUCHE

4. Material und Methoden nebst Herstellung der Materialien
5. Ergebnisse
6. Zusammenfassende Besprechung und Diskussion
7. Zusammenfassung
8. Literatur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Bekannt sind die im Kauffmann-White'schen Schema zusammengefaßten Antigenstrukturen von Salmonellen. Man unterscheidet im wesentlichen die typenspezifischen, an die Geißeln gebundenen H-Antigene sowie die an die Zellsubstanz gebundenen, gruppenspezifischen O-Antigene. Daneben sind noch eine Reihe unspezifischer H-Antigene sowie M-, Vi- und R-Antigene bekannt.

Auf der Antigenstruktur, besonders im Hinblick auf H- und O-Antigene, ist die serologische Diagnose aufgebaut. Die für jeden Typ gegebene Antigenformel kann im wesentlichen als konstant betrachtet werden. Ausnahmen davon bilden der Verlust von Geißeln und damit der Verlust der H-Antigene mit daraus resultierenden sog. O-Stämmen und die Erscheinungen der Transformation und der Transduktion, d.h. eine Übertragung genetischer Informationen durch Desoxyribonukleinsäure (DNS) anderer Typen.

Davon abgesehen, könnte man sich vorstellen, daß in der Zelle noch andere höhermolekulare Stoffe vorhanden sind, die nicht in die Antigenformel eingegangen, aber dennoch antigen sind. Diese Frage liegt umso näher, als die Zahl der in der Antigenformel angegebenen Antigene verhältnismäßig klein ist, sicherlich aber kleiner als die in dem so komplexen Gebilde einer Zelle vorhandenen höhermolekularen Stoffe. Letztere können - besonders wenn es sich um Eiweiße handelt - ohne Zweifel eine antigene Bedeutung haben.

In der vorliegenden Arbeit soll deswegen untersucht werden, ob Zellinhaltsstoffe von Salmonellentypen, die nach ihrer bekannten Antigenstruktur keine Antigengemeinschaft haben, nach Immunisierung von Kaninchen Kreuzagglutinationen ergeben und damit auf eine Verwandtschaft dieser Salmonellentypen untereinander hinweisen.

2. DIE ANTIGENSTRUKTUR VON SALMONELLEN UND DIE ISOLIERUNG VON ANTIGENEN

Bei der Salmonellagruppe handelt es sich um serologisch verwandte, gramnegative, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien. Diese bilden meist kurze Geißeln. Die Begeißelung ist peritrich. Die Keime greifen Laktose selten an und verflüssigen ebenfalls selten Gelatine. Eine Indolbildung wird nur gelegentlich beobachtet. Neuerdings kann man allerdings sagen, daß diese genannten Ausnahmen doch häufiger zu beobachten sind, als man anfangs annahm. Wird bei der Typhusdiagnostik aber auf diese biochemischen Leistungen der Keime zurückgegriffen, so hält man sich an die erstgenannten Angaben.

Grundsätzlich kann man sagen, daß die biochemische Leistung sehr variabel ist, im Gegensatz zur Antigenstruktur. Deswegen erhält man auch durch die serologische Diagnose ein sichereres Ergebnis.

Bei den H- oder Geißelantigenen handelt es sich um typenspezifische Stoffe, die bei einer Erhitzung auf 100°C für die Dauer von zwei Stunden thermolabil sind. Im Gegensatz dazu sind die gruppenspezifischen Körper- oder O-Antigene bei der gleichen Beeinflussung thermostabil.

Behandelt man Salmonellen mit Trichloressigsäure (Boivin und Mesrobeanu), dann lassen sich verschiedene säurelösliche organische Substanzen extrahieren. Dazu gehört unter anderen das Körperantigen der Bakterien, welches gleichzeitig als Endotoxin angesehen werden kann. Es handelt sich dabei um Stoffe, die mit Wasser aufgenommen eine opaleszierende Flüssigkeit geben, sich nicht dialysieren lassen und durch langdauerndes Zentrifugieren bei 16 000 U/min nicht sedimentiert werden können. Aus wässriger Lösung fallen sie bei Zusatz von Alkohol oder Azeton aus.

Dieses Endotoxin stellt einen Komplex aus einem Polysaccharid und Fettsäuren, Essigsäure und Phosphorsäure dar, ist also nicht eiweißartig. Verdünnt man eine solche Lösung, bildet sich eine Ausfällung. Dasselbe kann erreicht werden durch Zugabe des homologen Antikörper- (Ak-)serums.

Nach parenteraler Verabreichung kommt es im menschlichen oder tierischen Organismus zur Bildung von Praecipitinen und Agglutininen als spezifische Ak.

Boivin und Mesrobeanu teilen also nicht die Anschauung von Heidelberger, Avery u. Mitarb. über die Eiweißnatur des somatischen Antigen. Boivin nennt dieses isolierte Antigen zunächst ein komplettes Antigen, welches - zumindest bei bestimmten Keimen - die Tendenz hat, in

Kälte aus der Lösung auszufallen. Die Substanz verliert in neutralem Milieu bei Erhitzen auf 100-120°C ihre antigene Eigenschaft, behält aber die Toxizität. In leicht saurem Milieu verliert sie bei Erwärmen sowohl die Toxizität als auch die Antigenität unter gleichzeitiger Trennung der Fettsäuren und der in Lösung bleibenden Polysaccharide. Das auf diese Weise freigesetzte Polysaccharid kann mit Alkohol oder Azeton ausgefällt werden. Das Praecipitat dialysiert langsam bei Verwendung von Kollodiummembranen; es ist kein Vollantigen, fällt aber bei Zugabe des entsprechenden Akserums aus. Es handelt sich also um ein die Spezifität des antigenen Komplexes bedingendes Hapten.

Nach den Untersuchungen von Boivin und Mesrobianu befindet sich das geschilderte komplette Antigen nur in den S-Formen.

Torpley und Raistrick fanden mit einer anderen Methode eine Substanz mit analogen Eigenschaften aus denselben Keimarten. Diese Autoren führten nach vorhergehender Trypsinverdauung der Keime eine alkoholische Fällung durch und erhielten einen eiweißfreien Stoff, bei dem nach saurer Hydrolyse Zucker und Fettsäuren festgestellt werden konnten. Dieser Stoff war toxisch und antigen.

Für die unten besprochene Fragestellung sei also darauf hingewiesen, daß es sich hierbei nach dem methodischen Vorgehen um Substanzen handelt, die eiweißfrei sind. Boivin und Mesrobianu weisen aber auch darauf hin, daß die Bakterienzelle natürlich noch verschiedene andere antigene Substanzen enthält. Dazu gehören die Proteine und Nukleoproteide. Die diesen Stoffen entsprechenden Ak sollen aber nur gruppenspezifisch sein. Bei der Immunität sollen sie keine Rolle spielen. Für die Infektabwehr habe ein H-Ak keine Bedeutung. Man glaubte zunächst lange Zeit, daß für die Virulenz eines Keims und seine immunisierende Fähigkeit das somatische Antigen ausschlaggebend sei. Grinnell sowie Felix u. Mitarb. zeigten aber bei Typhusbakterien, daß Virulenz und immunisierende Eigenschaft an einen speziellen antigenen Faktor gebunden sind, der das O-Antigen begleitet. Dies soll nach diesen Untersuchungen das Vi-Antigen sein, welches aber bisher nur bei S. typhi und auch bei diesem Keim nicht immer nachgewiesen wurde.

Das komplette somatische Antigen bildet den Hauptbestandteil des Endotoxins der Keime. Die Injektion von komplettem Antigen in kleinen Dosen immunisiert ein Tier gegen Giftwirkung in größeren Dosen. Dabei entwickeln sich im Blut als freie Ak somatische Agglutinine gegen die entsprechenden Bakterien, spezifische Praecipitine gegen das komplette somatische Antigen und

gegen seine freie Polysaccharidfraktion, sowie Antitoxine, welche die Toxizität des kompletten Antigens neutralisieren.

Überdies findet man im Filtrat von Bouillonkulturen thermolabile, sehr toxische und antigene Exotoxine, aus denen sich unter Beibehaltung der antigenen Eigenschaft und Verlust der Toxizität ein Formoltoxoid oder Anatoxin herstellen läßt. Im Gegensatz zu den Endotoxinen handelt es sich bei den Exotoxinen um eiweißartige Stoffe.

Ein antiendotoxisches Serum praecipitiert nur das korrespondierende Endotoxin sowie das aus Polysaccharid bestehende Hapten. Auch agglutiniert es nur die homologen S-Formen. Darüber hinaus schützt es im Tierversuch gegen den toxischen Effekt des entsprechenden Glukolipidkomplexes. Der Unterschied zwischen Endo- und Exotoxin ist auch darin erkenntlich, daß ein antiexotoxisches Serum in vitro nicht mit Endotoxinen und Haptenen reagiert, die korrespondierenden Keime nicht agglutiniert und ebenfalls nicht die Toxizität der in den korrespondierenden Bakterien vorhandenen Endotoxine neutralisiert.

Damit ist deutlich getan worden, daß man das Endotoxin bzw. das komplette O-Antigen chemisch isolieren kann. Die immunologischen Reaktionen mit der isolierten Substanz sind vergleichbar denen, die man mit der kompletten Bakterienzelle erreicht. Grundsätzlich ist zu sagen, daß es nach dem Kauffmann-White-Schema möglich ist, die einzelnen Faktoren, die zusammen die Antigenstruktur eines Keimes bilden, serologisch zu erfassen.

Eine weitere Methode der Extraktion toxischer und antigener Substanzen aus Keimen der TPE- und Coligruppe ist die mit Diäthylenglykol (Morgan sowie Henderson u. Morgan).

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Extraktion mit Harnstoff. Man behandelt dabei Bakterien mit einer Harnstofflösung, die in Gegenwart von Toluol über Nacht auf Eis aufbewahrt wird. Dann wird mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Das sind die groben Züge der Antigengewinnung. Walker stellte fest, daß dabei aus Salmonellen Stoffe mit einem beträchtlichen Gehalt an Kohlehydraten, aber nur mit Spuren von Eiweiß extrahiert werden, die toxisch und antigen sind.

Alle diese Methoden sind für die Darstellung der Antigene zur chemischen und immunologischen Definierung bedeutsam, kommen aber für unsere Fragestellung nicht in Betracht, da das Zelleiweiß, auf das es uns speziell ankommt, durch diese Verfahren entfernt wird.

3. DER EINFLUSS HOMOSPEZIFISCHER IMMUNSEREN AUF SALMONELLEN

Schon häufig wurde der Einfluß homospezifischer Immunsereen auf Salmonellen untersucht. Dieses Problem war naheliegend, da man so durch in vitro-Versuche eine Antwort über das Verhalten von Salmonellen im infizierten Organismus zu erhalten wünschte. Dabei spielt natürlich die Frage einer mutativen Änderung eine besondere Rolle.

Bruner, Edwards u. Moran behandelten *S. blegdam* (9, 12, g, m, q) mit m- und q-Faktorensereen. Die Autoren beschrieben, damit g-, m- und g, q-Stämme erhalten zu haben, die also nach ihrem Antigensatz *S. enteritidis* (9, 12, g, m) und *S. Moskau* (9, 12, g, q) entsprachen. Darüber hinaus wurde eine serologische Umwandlung von *S. Oranienburg* (11, 12, m, t) in *S. Montevideo* (6, 7, g, m, s) durch Züchtung von Oranienburgbakterien in absorbiertem Oranienburgserum beschrieben. Der Unterschied zwischen den beiden genannten Versuchen besteht also darin, daß es sich im ersteren Falle um das Auftreten einer Verlustvariante, die leichter zu verstehen ist, handelt, im letztgenannten Falle aber um die Neugewinnung eines H-Faktors.

Gillissen, Heusel u. Franco beobachteten, daß Typhusbakterien in einem hochtitrierenden homologen Ak-Serum schnell zugrunde gehen. Bei sukzessiven Passagen in einem Medium mit einem geringen Gehalt an spezifischen Antikörpern verliert die Population aber den größten Teil des Antigengehalts. Diese Änderungen des serologischen Verhaltens sind reversibel.

Durch Immunisierungs- und Absättigungsversuche wurde wahrscheinlich gemacht, daß nach einem weitgehenden Verlust des Antigengehalts andere Faktoren mit antigener Wirkung zur Geltung kamen.

EIGENE VERSUCHE

4. MATERIAL UND METHODEN

Ziel der Untersuchungen war, die Zellinhaltsstoffe insgesamt auf ihre antigene Bedeutung auszutesten und festzustellen, ob es zwischen verschiedenen Typen zu Kreuzagglutinationen kommen kann, wenn Tiere mit diesen Zellinhaltsstoffen immunisiert worden waren. Deswegen war es erforderlich, Bakterienstämme mit einer völlig verschiedenen Antigenstruktur (nach dem Kauffmann-White-Schema) zu benutzen. Verwendet wurden die in Tab.1 angegebenen Typen.

Tabelle 1: Verwendete Salmonella-Typen

Name des Stammes	O-A Antigene	H-Antigene
S. paratyphi A	1, 2, 12	a
S. newport	6, 8	e, h
S. uganda	3, 10	1, z ₁₃

Die in Tab. 1 angegebenen Salmonella-Stämme wurden zunächst mit Faktorenseren (Behring-Werke) geprüft. Die Ergebnisse sind in Tab.2 wiedergegeben. Zur Verfügung standen nur die in Tab.2 angegebenen Seren.

Tabelle 2: Kontrolle der verwendeten Salmonella-Typen

Teststamm	Testserum	Agglutination
S. paratyphi A	O: 2	+
	O: 6, 7, 8	-
	H: a	+
	phys. NaCl	-

Fortsetzung der Tabelle 2:

Teststamm	Testserum	Agglutination
S. newport	O: 2	-
	O: 6, 7, 8	+
	H: a	-
	H: e, h	+
	phys. NaCl	-
S. uganda	O: 6, 7, 8	-
	O: 3, 10, 15	+
	H: a	-
	H: e, h	-
	phys. NaCl	-

Nach dieser Prüfung kann gesagt werden, daß es sich bei den Teststämmen um die angegebenen Typen handelt.

Zur Gewinnung der homospezifischen Immunsereen wurden Kaninchen mit einer Vaccine aus diesen Stämmen behandelt.

Die Herstellung der Vaccine geschah wie folgt: Pro Stamm wurden 5 Agarplatten mit je 0,3 ml einer 18-Stunden-Bouillonkultur beimpft. Die auf diese Weise erhaltenen Oberflächenkulturen wurden nach 22-stündiger Bebrütung jeweils mit 5 ml Phenol-phys. NaCl-Lösung (Phenolendkonzentration = 0,5%) abgeschwemmt, so daß sich von jedem Stamm 25 ml Suspension ergaben. Ein einstündiges Erhitzen dieser Suspensionen im Wasserbad von 56°C konnte die Keime aber nicht wie erwartet abtöten, was eine anschließende Sterilitätskontrolle zeigte.

Die beschriebenen Versuche mußten wiederholt werden. Vor Einbringen ins Wasserbad wurden den Suspensionen jetzt aber je 70 ml der auch zur Plattenabschwemmung verwendeten 0,5%igen Phenol-NaCl-Lösung zugesetzt. In dieser Verdünnung gelang es, durch nur halbstündiges Erwärmen im Wasserbad die Keime abzutöten, was angeschlossene Sterilitätsteste in Bouillon, auf Agar und Endoagar bewiesen. Daraufhin wurden die sterilen Vaccinen mit ihren homologen Faktorensereen und mit phys. NaCl-Lösung zur Kontrolle agglutiniert. Diese Prüfung ergab, daß kein Antigenverlust eingetreten war.

Um die drei Vaccinen auf gleiche Keimzahl einstellen zu können, mußte eine Keimzählung vorgenommen werden. Sie erfolgte in der Zeiss-Thoma-Zählkammer. Zur Verdünnung der Suspension auf 1 : 1000 diente eine Lösung, die aus 200,0 ml steriler NaCl-Lösung, 4,0 ml Formalin 30% und einigen Tropfen Methylenblau bestand.

Berechnung der Keimzahl:

$$X \times \text{Verdünnungsgrad} \times 250 \times 1000 = \text{Keimzahl/ml}$$

$$(\text{= Keimzahl/Kammer}) \quad (\text{= Kammerkonstante})$$

Es wurden jeweils in drei getrennten Ansätzen fünf große Quadrate (innerhalb der Zählkammer) ausgezählt; aus dem Mittelwert wurde die Konzentration der Keimsuspension berechnet. Durch Verdünnung mit 0,5% iger Phenol-phys. NaCl-Lösung wurde die Keimzahl in allen drei Vaccinen auf 11×10^9 Zellen/ml eingestellt.

Die Vaccinen dienten in der Folge zur Immunisierung von drei Kaninchen mit einem Gewicht von durchschnittlich je 2,0 kg. Die Vaccination erfolgte durch subcutane Injektion steigender Dosen der Impflösung in die Leistenbeuge. Im Abstand von je einer Woche wurden verabreicht 0,5 - 0,5 - 1,0 - 1,0 ml der Vaccine. Eine Woche danach erfolgte die Kontrolle des Ak-Titers bei allen drei Tieren mit der Gruber-Widal'schen Reaktion unter Verwendung von aus der Ohrvene entnommenem Blut. Jedes Serum wurde sowohl gegen den homologen Salmonella-Typ, mit dem vacciniert worden war, als auch zur Kontrolle der verwendeten Teststämme gegen die beiden anderen serologischen Typen ausgetestet. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in Tab. 3 wiedergegeben.

Tabelle 3: Ak-Titer der Immunseren

a. Immunserum nach Vaccination mit *S. paratyphi* A

Testkeim	Art des Titers	Reziproker Verdünnungswert des Serums					
		100	200	400	800	1600	3200
<i>S. paratyphi</i> A	H	+++	+++	++	++	+	-
	O	+++	+++	++	++	+	-
<i>S. newport</i>	H	-	-	-	-	-	-
	O	-	-	-	-	-	-
<i>S. uganda</i>	H	-	-	-	-	-	-
	O	-	-	-	-	-	-

Ergebnis: Titer = 1 : 1600 H und O

b. Immunerum nach Vaccination mit *S. newport*

Testkeim	Art des Titers	Reziproker Verdünnungswert des Serums					
		100	200	400	800	1600	3200
<i>S. newport</i>	H	++	+	<u>+</u>	?	-	-
	O	+++	++	+	<u>+</u>	-	-
<i>S. uganda</i>	H	-	-	-	-	-	-
	O	-	-	-	-	-	-
<i>S. paratyphi A</i>	H	-	-	-	-	-	-
	O	-	-	-	-	-	-

Ergebnis: Titer = 1 : 400 H und O, 1 : 800 H, O fraglich.

c. Immunerum nach Vaccination mit *S. uganda*

Testkeim	Art des Titers	Reziproker Verdünnungswert des Serums					
		100	200	400	800	1600	3200
<i>S. uganda</i>	H	+++	++	++	<u>+</u>	?	-
	O	+++	+++	+++	++	<u>+</u>	-
<i>S. paratyphi A</i>	H	-	-	-	-	-	-
	O	-	-	-	-	-	-
<i>S. newport</i>	H	-	-	-	-	-	-
	O	-	-	-	-	-	-

Ergebnis: Titer = 1 : 800 H, 1 : 1600 O.

Aus Tab. 3 ist zu entnehmen, daß die Widaltiter der drei Testseren zwischen 1 : 800 und 1 : 1600 lagen. Wesentlich ist ferner, daß eine Kreuzagglutination nicht zu beobachten war. Dies beweist, daß es sich um drei Bakterienstämme mit völlig verschiedenen Antigenstrukturen handelt.

Da diese Seren in der Folge einem Kulturmedium zugesetzt werden sollten, wurde eine 5%ige Phenollösung im Verhältnis 1 : 10 zugegeben. Es zeigte sich, daß diese Phenolendkonzentration von 0,5% eine Keimfreiheit bewirk-

te. Wie frühere Versuche (Gillissen, Heusel u. Franco) ergaben, stört dieser Phenolzusatz nicht, da die phenolhaltigen Seren in größeren Verdünnungen benutzt wurden.

Die später zu beschreibenden Versuche wurden sowohl mit den kompletten Zellinhaltsstoffen als auch mit Vaccinen aus Bakterien, die durch Züchtung in homologem Immuns serum vorbehandelt worden waren, durchgeführt. Die Züchtung in Serum mit den homologen Antikörpern (Züchtung in Passagen) hatte zum Ziel, einen passageren Verlust der H- und O-Antigene zu erreichen.

Zunächst wurden die Keime in einer Bouillon mit einem Zusatz des homologen Serums in einer Endverdünnung von 1 : 50 und höher gezüchtet. (Zur Kontrolle wurde eine entsprechende Stammlösung mit 0,5% Phenol und 0,8% NaCl benutzt.) Es wurde dabei festgestellt, daß die Keime in der Phenol-NaCl-Lösung (mit Bouillon) in Form einer homogenen Trübung wuchsen. In Gegenwart der homologen Ak-Seren wuchsen sie auf Grund des Agglutiningehaltes als Bodensatz, wobei die überstehende Flüssigkeit klar blieb. Bei Serumverdünnungen ab 1 : 400 (Endverdünnung) nahm eine allgemeine Trübung des Mediums immer mehr zu, bis eine Bodensatzbildung überhaupt nicht mehr zu beobachten war. Es zeigte sich nun, daß auch bei einer Serumverdünnung von 1 : 10 (Phenolendkonzentration 0,05%, entsprechend auch die Kontrolle) dieselbe Art des Wachstums wie bei der Serumverdünnung von 1 : 50 zu beobachten war. Für die weiteren Passagen wurden daher immer Serumendverdünnungen von 1 : 10 gewählt. Zur Kontrolle diente eine Phenol-NaCl-Lösung mit 0,05% Phenol und 0,09% NaCl in der Endverdünnung mit Bouillon. Die Passagen wurden täglich weitergeführt. Zur Kontrolle der Reinheit dieser Kulturen wurden von jeder Passage Subkulturen auf Endoagar angelegt. Da mit Änderungen des Antigengehaltes zu rechnen war, wurden auch in größeren Abständen Subkulturen auf Kligler-Nährböden und außerdem noch bunte Reihen mit Saccharose- und Laktose-Bouillon sowie Bleiacetatagar angelegt. Eine Kontrolle der Änderung des Antigengehaltes erfolgte sowohl mit den oben angegebenen Faktorens eren als auch mit den selbstgewonnenen Ak-Seren.

Wenn es zu einer Abnahme des Antigengehaltes der drei Stämme kommt, was nach den theoretischen Vorstellungen zu erwarten ist, dann müßte dies bei gleichbleibender Ak-Konzentration schon makroskopisch daran zu sehen sein, daß die Stämme nicht mehr - oder zumindest weniger - als Bodensatz, sondern in Form einer homogenen Trübung wachsen.

Da größere Mengen von Immuns eren notwendig waren, wurden öfters Blut-

entnehmen bei den vaccinierten Tieren durchgeführt. Die jeweilige Kontrolle des Widaltiters ergab, daß über die Versuchszeit keine Titeränderung stattfand. Deswegen konnte bei der Serumverdünnung 1:10 (mit der entsprechenden Phenolkonzentration) verblieben werden.

Im einzelnen wurde folgendes festgestellt:

Versuch mit S. paratyphi A:

Nach 43 Passagen in einer Bouillon mit homologem Ak-Serum wuchsen die Keime in Form einer homogenen Trübung. Ein Bodensatz war praktisch nicht mehr vorhanden. Die Keime wurden dann auf Agar ausgestrichen. Die darauf gewachsenen Keime ergaben mit dem homologen Ak-Serum keine Agglutination mehr. Die in der Bouillon mit Phenol-NaCl-Zusatz zur Kontrolle gezüchteten Keime wuchsen ebenfalls in Form einer homogenen Trübung mit ganz geringer Sedimentation. Die auf einer Subkultur (Agar) gewachsenen Keime ergaben eine deutliche Agglutination mit dem homologen Ak-Serum.

Versuch mit S. newport:

Die Keime wuchsen schon nach 14 Passagen in serumhaltiger Bouillon in Form einer homogenen Trübung. Nach Ausstrich auf Agar konnte mit dem homologen Ak-Serum keine Agglutination mehr erzielt werden. Da in der serumhaltigen Bouillon zu diesem Zeitpunkt aber noch ein Bodensatz aufgetreten war, wurden die Passagen noch weitergeführt. Das Ergebnis änderte sich bis zur 45. Passage jedoch nicht mehr wesentlich. Im Gegensatz dazu zeigten die in Bouillon mit einem Zusatz von Phenol-NaCl-Lösung gezüchteten Keime eine deutliche Agglutination in dem homologen Ak-Serum.

Versuch mit S. uganda:

Nach der 49. Passage wuchsen die Keime in Form einer homogenen Trübung mit geringem Bodensatz; aus einer Subkultur auf Agar zeigten sie aber noch eine geringe, als fraglich anzugebende Agglutination im homologen Ak-Serum. Deswegen wurden die Keime bis zur 62. Passage weitergeführt. Auch in diesem Stadium war außer der homogenen Trübung der Kultur noch eine geringe Bodensatzbildung festzustellen. Die Keime aus einer Subkultur auf Agar zeigten aber im homologen Ak-Serum keine Agglutination mehr. Im Gegensatz dazu agglutinierten die Keime aus der Phenol-NaCl-Kontrolle deutlich.

Zu diskutieren wäre, ob die Agglutination der drei Stämme aus den Kontrollreihen eine Paragglutination ist. Dies wurde wie üblich durch den Ver-

such einer Agglutination in phys. NaCl-Lösung ausgeschlossen.

Zu diskutieren wäre ferner, ob die gewonnenen Keime, die ihre typischen Antigene verloren haben, wirklich noch Salmonellen sind. Dies kann mit sehr großer Wahrscheinlichkeit aus zwei Gründen angenommen werden. Das biochemische Verhalten dieser Stämme auf Kligler-Nährböden und in der bunten Reihe entsprach völlig dem der noch nicht behandelten Ausgangskeime. Darüber hinaus war es möglich, durch weitere Passagen dieser Stämme in Bouillon ohne Serumzusatz bzw. auf Blutagar die charakteristischen Antigene wieder zu erhalten.

Der nicht mehr agglutinierende *S. paratyphi A* - Stamm zeigte schon nach 6 Passagen mit homologem Ak-Serum eine fragliche Agglutination, die nach insgesamt 22 Passagen deutlich war. Etwas länger dauerte es bei dem nicht mehr agglutinierenden Stamm von *S. newport*, welcher nach 25 Passagen in Ak-freiem Medium fragliche Agglutination und nach 42 Passagen wieder eine deutliche Agglutination ergab. Am schnellsten trat die Agglutinabilität wieder auf bei *S. uganda*. Hier wurde nach 4 Passagen eine fragliche und nach 19 Passagen eine einwandfrei deutliche Agglutination beobachtet.

Es soll an dieser Stelle nicht diskutiert werden, wie dieses Phänomen zu erklären ist, d.h. ob es sich dabei mehr um ein Phänomen der Adaptation oder - was wahrscheinlicher ist - um ein Phänomen der Selektion handelt.

Mit diesen zunächst in homologen Ak-Seren nicht mehr agglutinierenden drei Stämmen wurden wiederum Vaccinen hergestellt. Um eine Rückkehr der Agglutinabilität bei der Gewinnung größerer Bakterienmengen zu vermeiden, wurden die drei nicht mehr agglutinierenden Stämme sowie die dazugehörigen drei Kontrollstämmen, die in einer Bouillon mit Phenol-NaCl-Zusatz gewachsen waren, in einem größeren Volumen Bouillon mit Serumzusatz (bei Kontrolle kein Serum) gezüchtet. Nach 20-stündiger Bebrütung und Reinheitskontrolle der Stämme wurden die gleichen Volumina einer 1%igen Phenollösung zugegeben und alle Ansätze 30 Minuten im Wasserbad bei 56°C erhitzt. Die Sterilitätskontrollen ergaben eine Abtötung der Keime. Die in den Suspensionen enthaltenen Keime wurden in der Kühlzentrifuge (45 Minuten bei etwa 600 x g) abzentrifugiert und mit einer Phenol-NaCl-Lösung (Phenol = 0,5%, NaCl = 0,9%) gewaschen. Die dann wieder in Phenol-NaCl-Lösung resuspendierten Keime wurden auf Sterilität untersucht; die Keimzahl wurde nach mikroskopischer Keimzählung (s.o.) auf etwa 5×10^8 Zellen/ml eingestellt. Mit diesen zur Verfügung stehenden drei Vaccinen (ursprünglich gewachsen in Ak-Serum enthaltender Bouillon) wurde die Immunisierung von drei Kanin-

chen durchgeführt. Die drei Vaccinen aus den dazugehörigen Kontrollstämmen dienten lediglich als Antigene bei den später durchzuführenden Widalreaktionen. Eine Immunisierung mit den Kontrollstämmen war nicht erforderlich, da sie noch das normale Antigenbild der Ausgangsstämme besaßen.

Die Vaccination der Kaninchen erfolgte durch vier subcutane Injektionen im Abstand von je einer Woche und in Dosen von 0,5 - 0,5 - 1,0 - 1,5 ml. Eine Woche nach der letzten Injektion wurde Blut aus der Ohrvene der Tiere entnommen und das durch Abzentrifugieren erhaltene Serum durch einen Phenolzusatz (0,5%) in üblicher Weise haltbar gemacht. Mit diesen Seren wurden dann die später zu beschreibenden Versuche durchgeführt.

Weitere Untersuchungen sollten mit Immunseren durchgeführt werden, die nach Verabreichung der kompletten Zellinhaltsstoffe gewonnen wurden. Zu diesem Zweck war es erforderlich, die Bakterien mechanisch aufzuschließen.

Die drei nicht beeinflussten Teststämme wurden je auf 20 Agarplatten ausgestrichen und die Keime nach einer Kulturdauer von 20 Stunden bei 37°C mit 5,0 ml Aqua dest. pro Platte abgeschwemmt. Damit standen pro Stamm ~80 ml Keimsuspension zur Verfügung. Durch 2/3-Sättigung mit Azeton und Stehenlassen über 24 Stunden im Eisschrank wurden die Keime niedergeschlagen und abgetötet. Eine entsprechende Prüfung ergab Sterilität der Suspension. Eine solche Sterilitätskontrolle wurde nochmals mit dem durch scharfes Zentrifugieren gewonnenen Sediment durchgeführt; sie zeigte wieder das vorige Ergebnis.

Ferner wurden die Keime aus dem Sediment mit dem homologen Ak-Serum auf ihre Agglutinabilität geprüft; sie war vorhanden.

Diese Sedimente, nach der mikroskopischen Kontrolle aus morphologisch intakten Stäbchen bestehend, wurden mit phys. NaCl-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden dann in dem von Gillissen, Graubner u. Fleck entwickelten Gerät mechanisch zerstört. Anschließend wurden durch 30 Minuten langes Zentrifugieren bei etwa 600 x g der als Abrasiv beigegebene Quarzstaub sowie die vorhandenen Zelltrümmer und noch intakten Bakterien entfernt. Die verbleibende Flüssigkeit wurde nochmals in der Kühlzentrifuge bei 22500 U/min 30 Minuten lang zentrifugiert. Die so erhaltene Flüssigkeit wurde bei etwa -5°C aufbewahrt und zum Gebrauch langsam aufgetaut.

Zur Verfügung standen dann von diesen als Extrakte bezeichneten Lösungen folgende Volumina:

Extrakt aus <i>S. paratyphi</i> A	=	20,0 ml
Extrakt aus <i>S. newport</i>	=	30,0 ml
Extrakt aus <i>S. uganda</i>	=	15,0 ml

Die Bestimmung des Stickstoffgehaltes der Extrakte erfolgte mit der Mikro-Kjeldahl-Methode:

1 ml Extrakt wird unter Zugabe von Selen-Reaktionsgemisch feucht verascht. Dann wird mit Aqua dest. aufgefüllt. Von dieser Lösung gibt man 2,5 ml in die äußere Vertiefung einer Conway-Kammer und fügt 5,0 ml 32% ige Natronlauge zu. Die mittlere Vertiefung der Kammer enthält 1,0 ml 1% ige Borsäure und 2 Tropfen Tashiro-Indikator. Natronlauge und Borsäure müssen mit Vollpipetten eingefüllt werden: innere und äußere Flüssigkeit dürfen nicht miteinander in Berührung kommen. Die aufgefüllten Kammern (man stellt in der Regel pro Substrat drei Ansätze her) werden mit eingefetteten Schliffstopfen luftdicht verschlossen und einer Temperatur von 37°C ausgesetzt. Nach 24 Stunden wird die in der Mitte befindliche Flüssigkeit gegen n/10 oder n/100 H₂SO₄ titriert. Aus dem Verbrauch an H₂SO₄ läßt sich die entwickelte Stickstoffmenge errechnen. Ergebnisse siehe Tab.4.

Tabelle 4: Stickstoffgehalt der Extrakte

Extrakt	mg N ₂ /ml
aus <i>S. paratyphi</i> A	1,25
aus <i>S. newport</i>	0,9
aus <i>S. uganda</i>	1,55

Aus Tab.4 geht hervor, daß der Newport-Extrakt die geringste Menge an Stickstoff enthielt. Der Stickstoffgehalt im Paratyphus A- und Uganda-Extrakt wurde dem des Newport-Extraktes angeglichen durch Zusatz der entsprechenden Menge phys. NaCl-Lösung.

Diese drei Extrakte wurden nun zur Immunisierung von Kaninchen benutzt. Die Tiere erhielten zuerst je 2,0 ml subcutan in die Leistenbeuge. Die Reaktion auf diese sicher Antitoxin enthaltenden Lösungen war sehr gering. Die Tiere verweigerten einige Tage lang die Nahrung und zeigten eine entsprechende Gewichtsabnahme. Deswegen wurde die zweite Injektion erst nach

zwei Wochen mit je 0,5 ml Extrakt angeschlossen. Dann erhielten die Tiere in wöchentlichem Abstand noch zweimal je 1,0 ml. Die drei letzten Injektionen wurden gut vertragen.

Etwa eine Woche nach der letzten Impfung wurde aus der Ohrvene Blut entnommen, mit dessen Serum die unten zu besprechenden Versuche durchgeführt wurden.

Insgesamt standen also 9 Stämme (Vaccinen) nebst 3 Extrakten zur Verfügung sowie 9 verschiedene Seren. Diese gliedern sich wie folgt auf:

Serumgruppe I: S_{PI} S_{NI} S_{UI}
Seren der mit unbehandelten Keimen (Vaccinen) von *S. paratyphi A*, *S. newport* und *S. uganda* geimpften Tiere.

Serumgruppe II: S_{PII} S_{NII} S_{UII}
Seren der mit antigenfrei gezüchteten Keimen (Vaccinen) von *S. paratyphi A*, *S. newport* und *S. uganda* geimpften Tiere.

Serumgruppe III: S_{PIII} S_{NIII} S_{UIII}
Seren der mit Zellextrakt von *S. paratyphi A*, *S. newport* und *S. uganda* geimpften Tiere.

Testkeim 1: P_1 N_1 U_1
Unbehandelte Keime (Vaccinen) von *S. paratyphi A*, *S. newport* und *S. uganda*.

Testkeim 2: P_2 N_2 U_2
Antigenfrei gezüchtete Keime (Vaccinen) von *S. paratyphi A*, *S. newport* und *S. uganda*.

Testkeim 3: P_3 N_3 U_3
In Phenol-NaCl-Bouillon gezüchtete Keime (Vaccinen) von *S. paratyphi A*, *S. newport* und *S. uganda* (Kontrollvaccinen).

Dazu kommen noch die 3 Extrakte aus den 3 unbehandelten Keimen.

Nun sollte die Möglichkeit von Kreuzagglutinationen festgestellt werden. Nebenstehend sei eine schematische Darstellung des Untersuchungsprogramms gegeben (Abb. 1).

5. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen, die nach dem im vorhergehenden Kapitel wiedergegebenen Schema durchgeführt wurden, sind in den Tabellen 5 - 16 zusammengefaßt. In diesen Tabellen sind für jede Agglutinationsreihe zwei Werte angegeben. Die Agglutinationsstufen der oberen Reihe bedeuten jeweils das Ergebnis nach einer 2-stündigen Inkubation bei 37°C, was man sonst einer H-Agglutination gleichsetzen kann, die Angaben der unteren Reihe das Ergebnis nach weiterem 24-stündigem Aufbewahren bei Zimmertemperatur, was man sonst dem O-Titer gleichsetzt.

Abb.1: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung

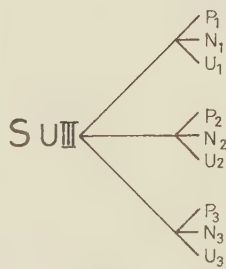
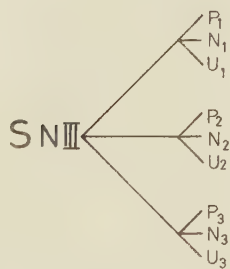
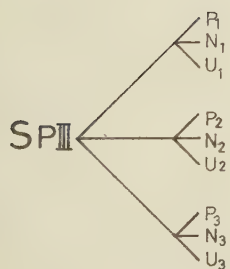
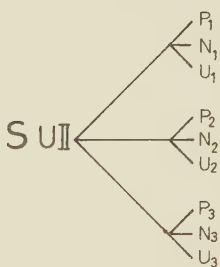
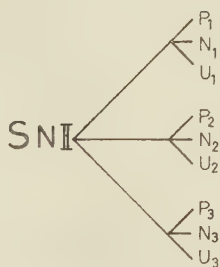
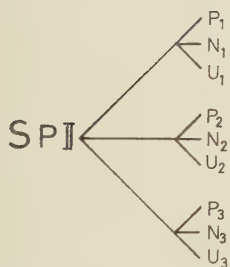
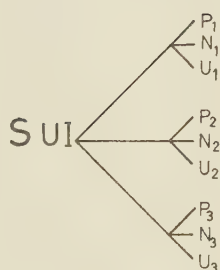
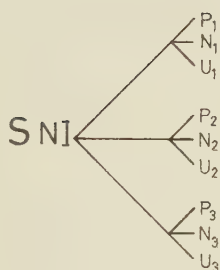
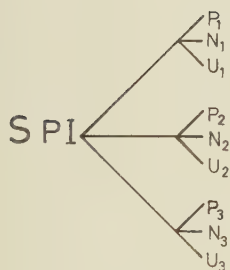
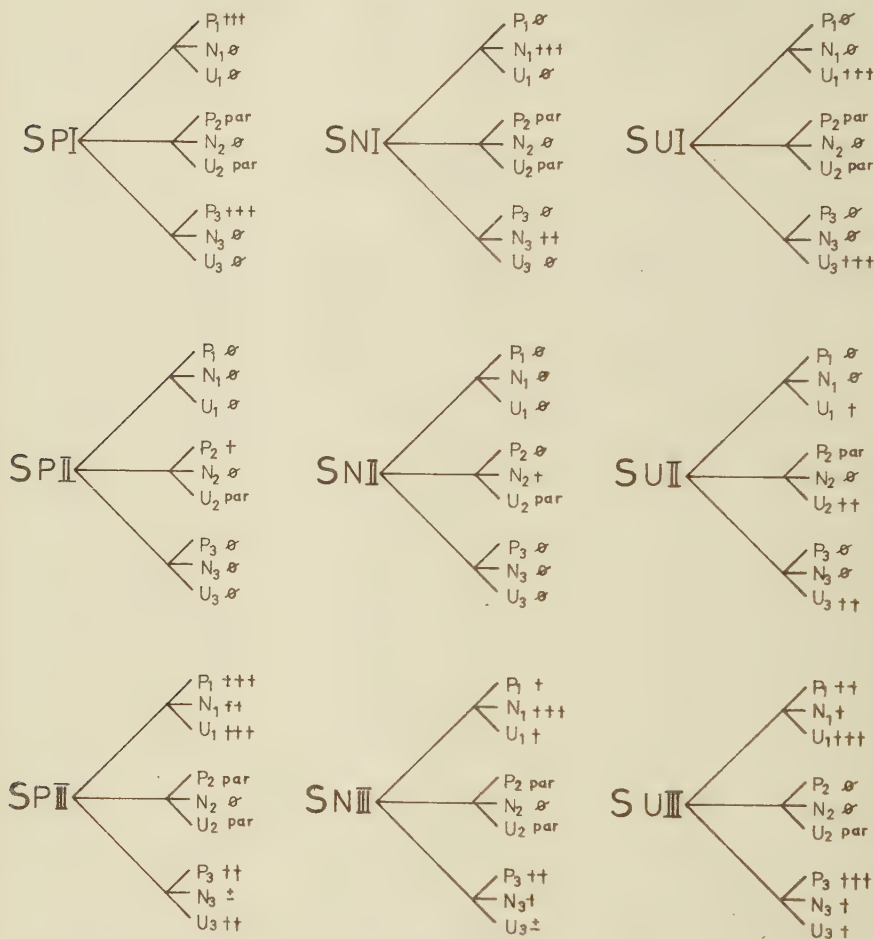


Abb.2: Zusammenfassende Darstellung aller Ergebnisse



Zeichenerklärung zu Abb.2:

$\emptyset$ = keine Agglutination

+ bis +++ = verschieden starke Agglutinationen mit entsprechend hohen Titerwerten

Par = Paragglutination

In diesen Fällen waren die Keime in den als Antigene benutzten Vaccinen schon in Abwesenheit von Serum und ohne weitere Verdünnung mit phys. NaCl-Lösung mehr oder weniger ausgeprägt zusammengeballt.

(Serum nach Immunisierung mit Vollantigen *S. paratyphi* A)

[illegible]

Tabelle 10: Ergebnis mit Serum S_{UII}

(Serum nach Immunisierung mit serumbehandelter S. ugan-
da)

Test- stamm	Reziproker Verdünnungswert des Serums									
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	NaCl
P ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	?	-	-	-	-	-
dünn und feinkörnig										
P ₂	Überall gleichbleibende feine Körnchen									
	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
N ₂	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U ₂	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+
	←	grob flockig				→	feinkörnig, gleichbleibend			
	++	++	++	++	++	++	+	"	"	"
P ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U ₃	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	←	grobkörnig				→	feinkörnig			
	+	++	++	++	++	+	+	-	-	-

Serumgruppe III

Tabelle 11: Ergebnis mit Serum S_{PIII}

(Serum nach Immunisierung mit Extrakt aus S. paratyphi A)

Test- stamm	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	NaCl
P ₁	+++	+++	++	++	++	+	?	-	-	-
	+++	+++	++	++	++	++	+	?	-	-
N ₁	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	++	+	<u>+</u>	?	-	-	-	-	-	-
	← körnig →									
U ₁	++	++	++	++	+	+	?	-	-	-
	+++	+++	+++	+++	++	++	+	<u>+</u>	-	-
	← flockig →						körnig			
P ₂	Überall gleichbleibende feine Körnelung									
	??	??	??	??	??	??	??	??	??	??
N ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U ₂	Überall gleichbleibende grobe Körnelung									
	??	??	??	??	??	??	??	??	??	??
P ₃	+	<u>+</u>	<u>+</u>	?	-	-	-	-	-	-
	++	++	++	+	?	-	-	-	-	-
N ₃	?	?	-	-	-	-	-	-	-	-
	<u>+</u>	?	?	-	-	-	-	-	-	-
U ₃	?	?	-	-	-	-	-	-	-	-
	++	+	++	++	++	+++	+	<u>+</u>	-	-
	← grobkörnig →					flockig feinkörnig				

Tabelle 12: Ergebnis mit Serum S_{NIII}

(Serum nach Immunisierung mit Extrakt aus S. newport)

Test- stamm	Reziproker Verdünnungswert des Serums									NaCl
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	
P ₁	$\frac{+}{+}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	$\frac{+}{+}$	?	-	-	-	-	-	-	-	-
	feinkörnig									
N ₁	++	++	+	?	-	-	-	-	-	-
	+++	+++	+++	++	++	+	$\frac{+}{-}$	?	-	-
U ₁	?	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	?	-	-	-	-	-	-
	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	?	-	-	-	-	-
	← körnig →									
P ₂	Überall gleichbleibende feine Körnchen									
	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
N ₂	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U ₂	Überall gleichbleibende starke Körnelung									
	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
P ₃	+	$\frac{+}{-}$	-	-	-	-	-	-	-	-
	++	++	?	-	-	-	-	-	-	-
	flockig körnig									
N ₃	$\frac{+}{-}$	+	+	$\frac{+}{-}$	?	-	-	-	-	-
	$\frac{+}{-}$	+	+	+	?	?	-	-	-	-
	← feinkörnig →									
U ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	?	?	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 15: Ergebnis mit Serum S_{NIII}

Test- stamm	Reziproker Verdünnungswert des Serums									
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	NaCl
P ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N ₁	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
	+++	+++	++	+	<u>+</u>	-	-	-	-	-
	flockig		← körnig →							
U ₁	?	<u>+</u>	?	-	-	-	-	-	-	-
	++	++	+	<u>+</u>	?	-	-	-	-	-
	feinkörnig →									
P ₂	Überall gleiche feine Körnelung									
	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
N ₂	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U ₂	Überall gleiche dichte Körnelung									
	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
P ₃	?	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	?	-	-	-	-	-	-	-
	feinkörnig									
N ₃	+	+	<u>+</u>	+	?	-	-	-	-	-
	+	++	++	+	<u>+</u>	?	-	-	-	-
	körnig		flockig	feinkörnig						
U ₃	?	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<u>+</u>	<u>+</u>	?	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 16: Ergebnis mit Serum S_{UIII}

Test- stamm	Reziproker Verdünnungswert des Serums									
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	NaCl
P ₁	?	?	-	-	-	-	-	-	-	-
	<u>+</u>	?	-	-	-	-	-	-	-	-
N ₁	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	?	-	-	-	-	-	-	-
dicht gekörnt										
U ₁	++	++	++	+	+	<u>+</u>	-	-	-	-
	++	++	++	++	++	++	+	?	-	-
P ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U ₂	Überall Körnelung, fraglich verstärkt gegenüber NaCl									
	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
P ₃	+	+	<u>+</u>	?	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-
N ₃	?	?	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	?	-	-	-	-	-	-	-	-
U ₃	+	+	<u>+</u>	+	+	+	?	-	-	-
	+	+	+	++	++	++	<u>+</u>	-	-	-
feinkörnig				flockig						

Die Ergebnisse von Tab. 5-16 sind nochmals schematisch zusammengefaßt in Abb. 2.

6. ZUSAMMENFASSENDE BESPRECHUNG UND DISKUSSION

Die Versuche ergaben, daß durch Züchtung in einem homologen Ak-Serum die Keime nach zahlreichen Passagen sowohl ihre H- als auch ihre O-Antigene verlieren. Nun ist natürlich die Frage abzuklären, ob es sich dabei noch um denselben Ausgangsstamm handelt. Eine Verunreinigung durch nicht agglutinierende gramnegative Stäbchen kann mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Gründe dafür sind folgende: Während der vielen Passagen wurden regelmäßig Subkulturen auf Endoagar und normalem Nähragar angelegt. Es zeigte sich in jedem Falle, daß es sich nach wie vor um eine Reinkultur laktosenegativer Keime handelte, und daß keine Verunreinigungen durch andere Keime vorlagen. Darüber hinaus wurde immer wieder einmal die biochemische Leistung der Teststämme untersucht; sie blieb stets gleich. Ferner wurde festgestellt, daß sich bei Weiterzüchtung der nicht mehr agglutinierenden Stämme in Ak-freien Medien (Bouillon, Blutagar) die spezifische Agglutinabilität wieder einstellte.

Daraus resultiert natürlich die Frage nach dem Wesen dieser Beobachtung. Eine bindende Aussage läßt sich darüber noch nicht machen. Es scheint aber am wahrscheinlichsten zu sein, daß das Verschwinden der Agglutinabilität durch eine Selektion spontaner Mutanten zustande kam. Dem würde auch das Wiederauftreten der Agglutinabilität nicht widersprechen. Man kennt ähnliche Erscheinungen auf dem Gebiet der Chemoresistenz. In Gegenwart von beispielsweise Penicillin kommt es zu einer Selektion von chemoresistenten Spontanmutanten, die beim Weglassen des selektionierenden Agens mit einer Zunahme der mittleren Sensibilität der Gesamtpopulation wieder verschwinden, weil die sensiblen Varianten eine kürzere Generationszeit, d.h. eine größere Wachstumsgeschwindigkeit besitzen (W e l s c h -Phänomen). Alle anderen Vorstellungen über den Effekt des homologen Ak-Serums, wie beispielsweise eine induzierte Transformation, sind dagegen weniger stichhaltig.

Es wurden Immunsereen hergestellt mit einer Vaccine aus drei Salmonella-Stämmen, die nach dem Kauffmann-White-Schema keinerlei Antigengemeinschaft besaßen (*S. paratyphi* A, *S. newport*, *S. uganda*). Diese Immunsereen agglutinierten in jedem Falle lediglich den homologen, also nicht vorbehandelten Keim. Dasselbe gilt auch für die Stämme, welche in Bouillon mit einem adäquaten Phenol-NaCl-Zusatz gezüchtet worden waren. Dieses Ergebnis war zu erwarten, beweist aber nachträglich noch einmal, daß die drei benutzten Salmonella-Stämme keine Antigengemeinschaft besaßen.

Dieselben (normalen) Immunseren agglutinierten aber die Stämme, welche in einem homologen Ak-Serum gezüchtet waren, nicht - ein Beweis dafür, daß die so vorbehandelten Stämme einen Antigenverlust erlitten haben.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Immunseren gewonnen unter Benutzung von Vaccinen aus den drei genannten Salmonella-Stämmen, welche aber durch Züchtung in Ak-haltigen Seren inagglutinabel geworden waren. Es wurde festgestellt, daß diese Seren lediglich die homologen Keime, die in einem Ak-Serum gezüchtet waren, agglutinierten und nicht die Keime mit normaler Antigenstruktur. Dies könnte vielleicht so gedeutet werden, daß durch die "Wegzüchtung" der aus dem Kauffmann-White-Schema bekannten Antigene andere, ebenfalls für den jeweiligen Stamm spezifische Antigene demaskiert worden sind. Andererseits wäre es auch möglich, daß durch die "Wegzüchtung" der bekannten Antigene noch weiter Änderungen auftreten, die sich immunbiologisch anders charakterisieren lassen.

In einer letzten Versuchsreihe wurden Immunseren gewonnen unter Verwendung von Extrakten (mechanische Zerstörung von Zellen der genannten drei Testkeime und Einstellung der drei Lösungen auf gleichen Stickstoffgehalt). Diese Immunseren ergaben nun in allen Fällen Kreuzagglutinationen mit den drei nicht behandelten Stämmen und den drei Kontrollstämmen (Phenol-NaCl), welche die aus dem Kauffmann-White-Schema bekannte Antigenstruktur besaßen. Diese Beobachtung könnte unseres Erachtens so gedeutet werden, daß bei der Gewinnung der Zellinhaltsstoffe Substanzen frei wurden, die bei allen drei, unter normalen Bedingungen immunologisch sonst völlig verschiedenen Stämmen eine gewisse Gemeinschaftlichkeit haben. Im Sinne der Arbeitshypothese könnte deswegen vielleicht daran gedacht werden, daß darin eine gewisse innere Beziehung zwischen Typen, die nach dem Kauffmann-White-Schema völlig verschieden sind, zum Ausdruck kommt.

Besonders zu diskutieren ist das Ergebnis des Zusammenbringens dieser Seren mit den Stämmen, die in Ak-Seren gezüchtet worden waren. In diesen Fällen ließen sich keine sicheren Agglutinationen nachweisen. Manchmal wurde eine Art Pseudoagglutination gesehen. Im ganzen kann man sagen, daß diese Seren die vorbehandelten Keime nicht agglutinierten. Ein Zufallsbefund kann ausgeschlossen werden, da die Untersuchungen bei Wiederholung das gleiche Ergebnis zeigten. Eine präzise Erklärung ist zunächst schwer möglich. Es wäre vielleicht daran zu denken, daß sich mit dem "Wegzüchten" der üblichen Antigenstruktur auch andere Faktoren geändert haben. Diese Vorstellung - allerdings eine Hypothese - ist nicht ganz von der Hand zu weisen; sie steht auch nicht in Widerspruch zu der Vorstellung einer Selektion prae-

adaptiver Mutanten bei Züchtung im homologen Ak-Serum und der spezifischen Agglutination in einem Immunserum, das durch Verwendung von Vaccinen der so behandelten Stämme gewonnen worden war.

Das Zustandekommen von Kreuzagglutinationen mit Immunseren, die unter Verwendung von Bakterienextrakten hergestellt worden sind, ist nicht leicht zu erklären, zumal bei der üblichen Vaccination auch diese Stoffe, wenn auch im Innern morphologisch intakter Zellen, ebenfalls verabreicht werden, ohne daß deswegen eine Kreuzagglutination auftritt. Diese Frage bedarf ebenso wie die nach einer möglichen praktischen Auswertung auf dem Gebiet der aktiven Immunisierung noch einer weiteren Bearbeitung.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Drei nach dem Kauffmann-White-Schema völlig verschiedene Salmonella-Typen (*S. paratyphi* A, *S. newport*, *S. uganda*) wurden in homologen Immunsereen gezüchtet. Nach einer größeren Zahl von Passagen wurde festgestellt, daß die Keimpopulationen ihren normalen Gehalt an H- und O-Antigenen verloren hatten. Bei Weiterzüchtung dieser behandelten Stämme in antikörperfreien Medien trat die normale Antigenstruktur wieder auf. Diese Beobachtungen sind nicht auf Verunreinigungen zurückzuführen. Das Zustandekommen dieser Erscheinungen wurde diskutiert.

Selbsthergestellte Immunsereen agglutinierten lediglich die homologen, nicht behandelten Testkeime mit normaler, üblicher Antigenstruktur, nicht aber die in antikörperhaltigen Seren gezüchteten Keime.

Seren, die mit Testkeimen nach Vorbehandlung in antikörperhaltigen, homologen Immunsereen gewonnen worden waren, agglutinierten ebenfalls nur die homologen, d.h. die mit antikörperhaltigen Seren vorbehandelten Keime.

Seren, die mit eiweißhaltigen Extrakten normaler Keime gewonnen worden waren, ergaben mit allen drei unbehandelten Teststämmen eine Kreuzagglutination, agglutinierten aber keinen der mit antikörperhaltigen Seren vorbehandelten Stämme.

8. LITERATUR

- Avery, O. T. et W. F. Goebel: Journ. exp. Med. 58, 731 (1933)
- Boivin, A. et L. Mesrobianu: Recherches sur les antigenes somatiques et sur les endotoxines des bacteries. - Revue d'immunologie 1, 553 (1935); 2, 113 (1936); 3, 319 (1937); 4, 40, 469 (1938)
- Bruner, D. W. and Edwards: J. Bact. 53, 359 (1947)
- Bruner, D. W., Edwards and Moran: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 61, 242 (1946)
- Bruner, D. W.: J. Bact. 57, 387 (1949); 64, 138 (1952); 65, 222 (1953); 67, 127 (1954)
- Felix, A. et S. S. Bhatnagar et R. M. Pitt: Brit. Journ. exp. Path. 15, 346 (1934)
- Felix, A. et R. M. Pitt: Journ. Path. Bact. 38, 409 (1934) et Lancet 227, 186 (1934)
- Freeman, G. G., S. W. Challinor and J. Wilson: The use of a synthetic medium in the isolation of the somatic antigens of Bact. typhimarium and Bact. typhosum. - Biochemical Journal 341, 307 (1940)
- Gillissen, G. und I. M. Gillissen: Die Resistenzbildung bei Mikroorganismen. Ergebnisse der Mikrobiologie, Immunitätsforschung und experimentellen Therapie. Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 33, 128 (1960)
- Gillissen, G., A. Graubner und W. Fleck: Die Gewinnung von Zellinhaltsstoffen aus Mikroorganismen auf mechanischem Weg. - Biochem. Z. 331, 455 (1959)
- Gillissen, G., E. Heusel und M. Franco: Das serologische Verhalten von Typhusbakterien nach Beeinflussung mit Immunsereen. - Archiv für Hygiene und Bakteriologie 138, 408 (1954)
- Grinnell, F. B.: Journ. exp. Med. 56, 907 (1932)
- Hallmann, L.: Bakteriologie und Serologie. - Georg Thieme-Verlag, Stuttgart
- Heidelberger, M. et A. E. O. Menzel: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 32, 1150 (1935)

Henderson and W. T. J. Morgan: Brit. J. exp. Path. 19, 82 (1938)

Kauffmann, F. : Die Bakteriologie der Salmonellagruppe. - Verlag Einar Munksgaard, Kopenhagen, 1941.

Kauffmann, F. : On the transduction of serological properties in the salmonella group. - Act. path. microbiol. Scand. 33, 409 (1953)

Morgan, W. T. J. : Studies in immuno-chemistry. - Biochem. J. 31, 2003 (1937, I)

Morgan, W. T. J. : Chem. Ind. Rev. 56, 446 (1937, II)

Raistrick and Topley: Brit. J. exp. Path. 15, 113 (1934)

Schmidt, H. : Fortschritte der Serologie. - Verlag Dr. Dietrich Steinkopff, Darmstadt 1955, 2. Auflage

Walker, J. : A method for the isolation of toxic and immunizing fractions from bacteria of the salmonella group. - Biochem. Journal 34, 325 (1940)

Herrn Professor Dr. K l i e w e möchte ich danken, daß ich die Möglichkeit hatte, in seinem Institut zu arbeiten.

Herrn Professor Dr. Dr. Gillissen danke ich herzlich für die Überlassung des Themas.

Auch danke ich Fräulein E. Heusel für ihre Hilfe bei der technischen Durchführung der Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 5.III.1937 wurde ich, Helga Änne Lahr, als Tochter des Landwirts Johann Lahr und seiner Ehefrau Johanna, geb. Bretz, in Gumbsheim/Rhh. geboren. Mein Vater starb im Jahre 1941. Vom 6. bis zum 10.Lebensjahr besuchte ich die Volksschule in Gumbsheim und trat im November 1947 in das Progymnasium Wöllstein ein. Das Staatliche Neusprachliche und Naturwissenschaftliche Gymnasium Alzey besuchte ich von Ostern 1953 bis zur Reifeprüfung, die ich im Februar 1956 ablegte. Im Sommersemester 1956 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Hier bestand ich im August 1958 die ärztliche Vorprüfung. Ich beabsichtige, nach 6 klinischen Semestern an der gleichen Universität im Sommer 1961 das medizinische Staatsexamen abzulegen.

